

夏枯草黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松的抑制作用

刘华¹, 钟业俊², 吴丹³

(1. 江西科技师范大学生命科学学院, 江西南昌 330047) (2. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330013) (3. 江西省药品审评中心, 江西南昌 330047)

摘要: 本研究通过干预去卵巢大鼠骨质疏松动物模型, 探讨夏枯草黄酮对骨质疏松大鼠骨量、生物力学性能及骨代谢的影响。经夏枯草黄酮处理后, 取血清检测血矿物质、护骨素(OPG)、碱性磷酸酶量(ALP)的含量变化, 取各组股骨进行骨密度测定和骨组织形态检测, 并用荧光定量PCR的方法检测I型胶原、整合素 $\beta 1$ 与粘着斑激酶的mRNA表达。结果显示, 夏枯草黄酮组ALP(3.03 ± 0.22 IU/L)、破骨细胞数(0.23 ± 0.05 1/mm²)、骨吸收周长百分数($14.94 \pm 5.12\%$)低于模型组($P < 0.05$), 而OPG量(186.34 ± 44.21 pg/mL)、骨密度、骨小梁相对体积($26.11 \pm 5.32\%$)和厚度(587.16 ± 165.01 μm)与模型组相比则有所增加($P < 0.05$); 表明夏枯草黄酮能够提升去卵巢大鼠的成骨细胞的功能, 减缓骨吸收和骨代谢, 促进骨形成, 降低骨小梁损失, 抑制骨量减少与骨强度降低, 从而提升去卵巢大鼠的骨密度, 最终对骨质疏松症起到了抑制作用。

关键词: 夏枯草黄酮; 骨质疏松; 骨组织形态测量; 骨密度; 护骨素; 碱性磷酸酶; mRNA表达

文章篇号: 1673-9078(2014)8-6-11

Inhibitory Effect of *Prunella vulgaris* L. Flavonoids on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

LIU Hua¹, ZHONG Ye-jun², WU Dan³

(1. School of Life Science, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330047, China)

(2. The National Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Nanchang 330013, China)

(3. Jiang Xi Provincial Center For Drug Evaluation, Nanchang 330047, China)

Abstract: In this study, the effect of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. on bone mass, biomechanical properties, and bone metabolism of ovariectomized, osteoporotic rat model was investigated. After treatment with flavonoids extracted from *P. vulgaris* L., rat serum samples were collected to examine changes in the levels of blood minerals, osteoprotegerin (OPG), and alkaline phosphatase (ALP). The femur bone was also collected from rats in each group to measure bone mineral density (BMD) and bone tissue morphology. A fluorescent quantitative polymerase chain reaction approach was used to determine the expression levels of collagen type I, integrin $\beta 1$, and focal adhesion kinase mRNA. The results showed that the level of ALP (3.03 ± 0.22 IU/L), number of osteoclasts (0.23 ± 0.05 1/mm²), and bone resorption perimeter percentage ($14.94\% \pm 5.12\%$) were lower in the flavonoids group than in the control group ($p < 0.05$). In contrast, the levels of OPG (186.34 ± 44.21 pg/mL), BMD, and the relative volume ($26.11\% \pm 5.32\%$) and thickness (587.16 ± 165.01 μm) of trabecular bone were higher ($p < 0.05$) in the flavonoids group than in the control group. The results indicated that *Prunella vulgaris* L. flavonoids enhanced osteoblast function, decreased bone resorption and bone metabolism, increased bone formation, reduced trabecular bone loss, and inhibited the reduction in bone mass and bone strength, thus enhancing BMD and ultimately suppressing osteoporosis in ovariectomized rats.

Key words: *Prunella vulgaris* L. flavonoids; osteoporosis; bone tissue morphology detection; bone mineral density; osteoprotegerin; alkaline phosphatase; mRNA expression

夏枯草 (*Prunella vulgaris* L.) 为唇形科夏枯草属

收稿日期: 2014-02-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360205)

作者简介: 刘华 (1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事天然活性物质的研究与开发

通讯作者: 钟业俊 (1982-), 男, 博士, 讲师, 主要从事食物资源的开发与利用研究

植物, 主要作为一种传统的中草药, 广泛应用于治疗发烧、咽喉疼痛和促进伤口的愈合等^[1]。近年来, 由于夏枯草中含有黄酮类^[2]等多种生物活性物质而受到广泛关注。何晓燕等^[3]研究表明夏枯草黄酮降血压的功效, Lee 等^[4]报道夏枯草提取物具有显著的抗癌作用, 李东等^[5]研究发现夏枯草提取物在体外对肺癌 A549、肝癌 SMMC-7721 具有明显的抑制作用, 同时

流式细胞仪测定结果显示夏枯草抗炎诱导肿瘤细胞凋亡。Horikawa 等^[6]发现,夏枯草属植物对 1,6-二硝基苯并芘和 3,9-二硝基荧蒽的致癌、致突变作用有明显的拮抗作用。马丽萍等^[7]在研究夏枯草对人食道癌 ECa109 细胞促凋亡的实验中发现,夏枯草提取物作用后,ECa109 的细胞周期发生了明显的变化,肿瘤细胞的增殖得到抑制。但夏枯草黄酮对抑制骨质疏松症的活性的研究还没有相关的研究和报道。

骨质疏松是危害中老年人健康的常见病,绝经后妇女尤其易于罹患此病,发病率达 50%。绝经后骨质疏松症 (PMO) 患者骨的脆性增高,骨折危险性增加。雌激素替代疗法 (ERT) 是防治和治疗绝经后骨质疏松症以及预防骨折的首选方案,但因长期使用雌激素类药物有导致乳腺癌、子宫内膜癌的潜在危险,因此选用毒副作用小、标本兼治并可长期服用的中草药治疗绝经后骨质疏松症已成为国内医学界的研究热点。利用动物卵巢切除后容易引起骨质流失,进而导致骨质疏松症的发生;实验前期研究表明,夏枯草黄酮对去卵巢大鼠的骨质疏松症具有一定的抑制作用。在此基础上,本文旨在深入探讨夏枯草黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松症的抑制作用,从分子机制及骨密度骨形态测量两个方面分别入手进行研究,一方面从分子水平探讨夏枯草黄酮对去卵巢骨质疏松模型大鼠血矿物质 (Ca、P 和 Mg)、护骨素 (OPG)、碱性磷酸酶 (ALP) 和 I 型胶原、整合素 $\beta 1$ 与粘着斑激酶的 mRNA 表达的影响;另一方面由骨密度测量和骨形态检测入手进行研究大鼠骨微观结构和骨代谢动态水平。最终将研究结果加以综合,以期揭示夏枯草黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松的抑制方式,为夏枯草黄酮在食品、医药及化妆品等领域的开发和应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 8 周龄 SD 雌性大鼠 (许可证编号: 0064257) 24 只,体质量 (150±10) g,分 8 笼予以常规饲料喂养,自由饮水,饲养室保持良好通风,控制室温在 21±1 °C,湿度 60%,噪音 < 50 分贝,光照与黑暗时间为每 12 h 交替。

1.2 实验方法

夏枯草黄酮的制备:采用何力等^[8]的方法进行夏枯草黄酮的提取纯化,纯化后的纯度为 81.6%,经真空冷冻干燥得到夏枯草黄酮粉末。将其配置成 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的水溶液,备用。

分组与建模:所有大鼠随机分为 3 组,假手术组,模型组、夏枯草黄酮组,每组 8 只。

去卵巢骨质疏松模型的制备:模型组与夏枯草黄酮组大鼠采用体积分数 1% 的戊巴比妥钠,按照 40 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉,背侧入路,以脊柱旁 1 cm、后方髂骨嵴上 2 cm,取长约 1 cm 的纵行切口,暴露双侧腹腔卵巢并进行切除后,用丝线将残端结扎后逐层关闭伤口。假手术组切口同前,进入腹腔后,找到卵巢后并不切除,只切除与双侧卵巢重量相近的左右大网膜各一段,清创缝合及术后处置与去卵巢组相同。术后连续 3 d 肌注青霉素注射液,给予普通饲料,自由饮食。

给药:术后一周,将夏枯草黄酮组大鼠予以夏枯草黄酮水溶液灌胃 (10%, *m/m*),连续给药 12 周,假手术组、模型组给予等量双蒸水灌胃。使用 20% 乌拉坦按 1 mg/kg 腹腔注射麻醉,暴露大鼠腹主动脉,取血后,4 °C 低温离心取血清。

血矿物质、ALP 及 OPG 测定:应用全自动生化分析仪测定血矿物质及 ALP 浓度,ELISA-竞争法测定 OPG,测定按照试剂盒说明书进行。

荧光定量 PCR 检测:24 h 后处死所有大鼠,迅速取第 3 腰椎,剔除周围软组织,快速匀浆后,应用 Trizol 法提取总 RNA,4 °C 保存。SYBR GREEN PCR 反应 (25 μL) 体系,按以下顺序加样:SYBR (Premix Ex TaqTM 12.5 μL , ROX Reference Dye II 0.2 μL),上下游引物各 0.5 μL ,cDNA 模板 2 μL ,DEPC 水 9 μL 混匀,离心。I 型胶原蛋白上游引物:5'-CTGGTCCC AAGGGTAACAG3',下游引物:5'-ACTTGCCA AGAGGACCG-3',扩增片段长度 285 bp;整合素 $\beta 1$ 上游引物:5'-CGCGGATCCGCGAA GCTTTTAATG ATAATTC-3',下游引物:5'-GGCGAATTCGTC ATTTTCCCTCATACTTCTTC-3' 扩增片段长度 144 bp;粘着斑激酶 (FAK) 上游引物 5'-TTGCGGA GAATATGGCTGACCTAA-3',下游引物,5'-TGGT ATTGATGGCAAAGCCCGTTC-3';扩增片段长度 116 bp;内参照 β -actin:5'-CCCATCACC ATCTTCCAG-3',下游引物:5'-GGTGAGAACTCAAGACCTACC GTC-3',扩增片段长度 155 bp。

SYBR GREEN PCR 反应:95 °C 10 s,预变性,95 °C 5 s 变性,60 °C 退火,延伸,45 循环。得到扩增曲线与 CT 值。95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s,进行溶解曲线的分析。计算每一样本和其内参对照的相对含量:以每 μL 样本 cDNA 所含目的基因的拷贝数与每 μL 样本 cDNA 所含 β -actin 的拷贝数的比值进行半定量比较。

骨密度检测：应用 Norland-XR46 数字化双能 X 射线骨密度测量仪，测量各组大鼠左侧股骨骨密度 (bone mineral density, BMD)。依据骨密度测量仪实际扫描测量的股骨长度，将其均分为 4 等分，上 1/4 为近端 (pBMD)，中 1/2 为中段 (mBMD)，下 1/4 为远端 (dBMD)。以左侧股骨骨密度为研究对象已可以说明问题。

取大鼠右侧完整的股骨、胫骨进行称重及骨组织形态测量。骨组织形态测定的骨标本制作方法：取大鼠右侧股骨下端，经 10%福尔马林固定、脱水、甲基丙烯酸甲酯包埋、不脱钙切片后，未测量进行 Von Kossa 及 Giemsa 染色。用莱卡 DM4000B 荧光/光学显微镜观察与摄取图像。

骨组织形态测量指标及方法：骨组织形态的动态和静态参数利用股骨远端干骺端生长板下 1~4 mm 范围内的次级松质骨进行测量，分内、中、外 3 点随机选取图像并保存，每个标本采用两种观察方法。组织学观察用 Giemsa 染色、普通光源；类骨质观察用 Von Kossa 染色，然后采用 Leica 彩色病理图像分析软件进行骨组织形态参数测定^[9]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理，结果以 $x \pm s$ 表示，各组比较用 LSD-t 检验。p<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 模型组、假手术组与夏枯草黄酮组的血清矿物质比较

表 1 模型组、假手术组与夏枯草黄酮组的 Ca、P、Mg 含量比较 (n=8)

Table 1 Comparison of the content of Ca, P, Mg on Model, Sham operation and *Prunella vulgaris* L flavonoids group

血清矿物质 / (mmol/L)	模型组	假手术组	夏枯草黄酮
Ca	2.28±0.11	2.34±0.08	2.23±0.17
P	1.59±0.21	1.61±0.19	1.62±0.11
Mg	0.61±0.10	0.55±0.08	0.56±0.11

注：P>0.05，数据无显著性差别。

切除卵巢的动物模型是研究绝经后的妇女骨质疏松症的一个非常有用的临床模型，血清矿物质含量是量化骨量的重要指标。表 1 列出了三组实验大鼠的血清矿物质 (Ca、P、Mg) 数据比较。实验发现，模型

组、假手术组与夏枯草黄酮组的血清 Ca、P 和 Mg 含量差别并不显著。这表明夏枯草黄酮的加入后，既不会增加也不会降低去卵巢后大鼠的血清矿物质 (Ca、P、Mg) 的含量。这可能是由于大鼠去卵巢后，雌激素水平下降，骨吸收大于骨形成，而骨矿物质的丢失是一类非常缓慢的过程，故血清中钙、磷的含量则表现为钙、磷、镁的含量变化不大^[10]，这也进一步表明夏枯草黄酮能够有效防止去卵巢大鼠的骨矿物质的丢失和维持血清矿物质的平衡。

2.2 模型组、假手术组与夏枯草黄酮组的护骨素 (OPG) 碱性磷酸酶 (ALP) 量比较

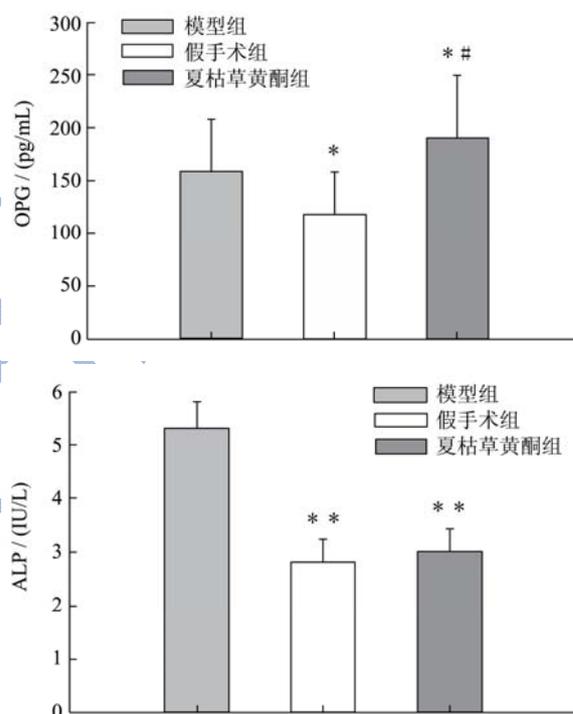


图 1 模型组、假手术组与夏枯草黄酮组的护骨素 (OPG) 碱性磷酸酶 (ALP) 量比较

Fig.1 Comparison of the content of ALP and OPG on Model, Sham operation and *Prunella vulgaris* L flavonoids group

注：n=8，*P<0.05，**P<0.01 与模型组对比，#P<0.05 与假手术组对比。

众所周知，骨形成和骨吸收之间的平衡对于骨量和骨微观结构是至关重要的^[11]。一般认为 ALP 是作为评估骨形成的重要标志，ALP 活性的升高是伴随着骨吸收亢进而出现的代偿性骨形成而增加引起的，进而进入一种高转换状态并带来一系列的骨骼疾病^[12]。使 ALP 活性的降低能够有效地缓解这种高转换状态，并最终对骨吸收具有抑制作用；而 OPG 作为为破骨细胞生长的抑制剂^[13]。图 1 列出了三组实验大鼠的 OPG

与 ALP 之间的数据比较。实验发现, 模型组与假手术组相比, 血清中 ALP 量明显的增加, 从 2.87 IU/L 增加到了 5.18 IU/L, 而 OPG 的分泌降低, 从 156.8 pg/mL 降低到 119 pg/mL。当用夏枯草黄酮处理后的去卵巢大鼠后, 相对于模型组, 血清中 ALP 分泌降低到了 3.02 IU/L, 而 OPG 量 (181.4 pg/mL) 显著的高于了模型组与假手术组, 各组之间差异显著。这表明夏枯草黄酮可以有效的抑制 ALP 活性的升高, 使 OPG 的含量增加, 使高转换状态得到改善, 从而转变骨形成和骨吸收的平衡, 这有利于骨质的净增长和防止骨量的丢失, 这可能就是夏枯草黄酮对去卵巢大鼠骨质疏松的抑制作用机理。

2.3 I 型胶原、整合素 $\beta 1$ 、粘着斑激酶 (FAK)

mRNA 表达结果

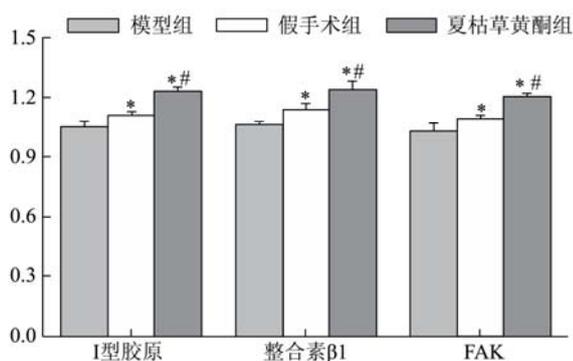


图2 模型组、假手术组与夏枯草黄酮中 I 型胶原、整合素 $\beta 1$ 、FAK mRNA 表达结果比较

Fig.2 Results comparison of RNA expression on Model, Sham operation and *Prunella vulgaris L flavonoids* group

注: n=8, *P<0.05, 与模型组对比; #P<0.05, 与假手术组对比。

由图 2 可见, 实验结果表明模型组 I 型胶原、整合素 $\beta 1$ 、FAK mRNA 表达在术后 12 周与假手术组相比都分别有了明显下降(1.11 降至 1.05, 1.14 降至 1.06 和 1.09 降至 1.03)。而夏枯草黄酮组 3 个指标的 mRNA 表达则分别显著高于模型组 (1.11 升至 1.23, 1.14 升至 1.24 和 1.09 升至 1.21)。说明通过切除卵巢, 人为地造成雌激素水平下降, 骨吸收增加, 骨基质中的 I 型胶原分解加速, 成骨细胞合成 I 型胶原也减少; 细胞外环境的改变影响了成骨细胞的整合素 $\beta 1$ 表达, 由此可能导致成骨细胞与 I 型胶原等细胞外基质蛋白的结合减少, 粘附减少, 成骨细胞无法发挥应有的成骨功能; FAK 是整合素将细胞外信号传入细胞骨架的下游环节, 整合素 $\beta 1$ 表达减少, 直接影响了 FAK 的表达。经过夏枯草黄酮处理后, 其 3 个指标的 mRNA 表

达都明显超过假手术组, 推测成骨细胞在夏枯草黄酮的作用下, 能够促进成骨细胞 I 型胶原、整合素 $\beta 1$ 和 FAK mRNA 超过正常水平地表达, 以尽快实现细胞粘附。从而一方面使成骨细胞与细胞外基质的结合能力增加, 成骨活性提高; 另一方面促进成骨细胞增殖与分化^[14]。

2.4 骨密度检测结果

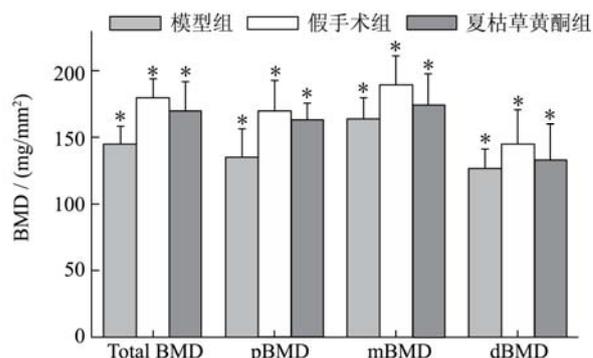


图3 模型组、假手术组与夏枯草黄酮中骨密度 (BMD) 值比较

Fig.3 Comparison of BMD content on Model, Sham operation and *Prunella vulgaris L flavonoids* group

注: n=8, *P<0.05, 与模型组对比。

骨密度是评价骨量最有说服力的指标之一, 是骨质量的一个重要标志, 反映骨质疏松程度, 预测骨折危险性的重要依据。由图 3 可以看出, 模型组大鼠股骨全长骨密度 (145.23 mg/mm²)、近端骨密度 (135.42 mg/mm²)、中端骨密度 (164.13 mg/mm²) 和远端骨密度 (127.26 mg/mm²) 均显著低于假手术组 (178.32、172.56、192.11 和 147.43 mg/mm²) (P<0.05), 夏枯草黄酮组各段骨密度 (168.12、163.86、176.81 和 135.23 mg/mm²) 均显著高于模型组 (P<0.05); 这表明夏枯草黄酮能通过抑制卵巢摘除后的高骨转换率, 以及抑制破骨细胞的骨吸收过程, 使骨形成和骨密度增加在去卵巢大鼠切除的模型中^[15]。

2.5 骨组织形态检测结果

表 2 显示了骨组织形态检测结果, 假手术组骨小梁相对体积和厚度显著的高于模型组 (P<0.05), 骨小梁分离度及骨吸收周长百分数、破骨细胞数、类骨质周长百分数和骨形成率比模型组显著更低 (P<0.05)。这是由于大鼠去卵巢后机体为了抵抗雌激素减少对骨骼的影响, 刺激成骨细胞, 使之活动增强, 数目增多, 表现为骨小梁类骨质周长百分率明显增加 (17.66%), 同时又使破骨细胞活性增强, 骨吸收增加。但由于骨吸收大于骨形成, 骨小梁变稀疏、骨质丢失, 出现高转换型骨质疏松^[16]。经夏枯草黄酮处理后, 骨小梁相对

体积和骨小梁厚度显著高于模型组, 骨吸收周长百分数与破骨细胞数显著低于模型组, 且差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。以上骨组织形态检测评估更能形象和直

观的表明, 夏枯草黄酮能促进骨的形成, 防止骨质的丢失, 降低骨小梁的损失, 对去卵巢大鼠骨质疏松起到抑制作用。

表2 模型组、假手术组与夏枯草黄酮组的骨组织形态测量结果比较 (n=8)

Table 2 Results comparison of bone tissue morphology detection on Model, Sham operation and *Prunella vulgaris* L flavonoids group

	模型组	假手术组	夏枯草黄酮组
骨小梁相对体积/%	16.73±4.59	31.27±4.51*	26.11±5.32*
骨小梁厚度/ μm	48.96±8.64	87.12±8.95*	72.33±7.17*
骨小梁分离度/ μm	769.15±121.14	375.42±92.43*	587.16±165.01*
骨吸收周长百分数/%	17.66±4.61	8.98±4.42*	14.94±5.12**
破骨细胞数($1/\text{mm}^2$)	0.33±0.05	0.11±0.03*	0.23±0.05**
类骨质周长百分数/%	32.43±6.17	18.90±5.97**	33.19±6.01
骨形成率(%/yr)	38.15±5.99	55.07±6.85*	63.71±11.66*

注: * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, 与模型组对比。

3 结论

目前, 治疗绝经后骨质疏松症的药物和激素治疗都会有一些副作用和增加乳腺癌和子宫内膜增生的风险。一项流行病学研究指出, 食用富含水果、蔬菜和中草药能够增强骨密度^[17-18]。卵巢切除后会引骨质流失, 进而导致骨质疏松症的发生; 通过本实验, 我们发现夏枯草黄酮能有效的降低卵巢切除大鼠的 ALP、破骨细胞数、骨吸收周长百分数, 而会使 I 型胶原、整合素 $\beta 1$ 与 FAK 的 mRNA 表达^[19-20], 骨密度, OPG 骨小梁相对体积和厚度显著升高。这表明夏枯草黄酮能够增强了去卵巢大鼠的成骨细胞的功能, 减缓了骨吸收和骨代谢, 促进骨的形成, 降低骨小梁的损失, 抑制骨量减少与骨强度降低, 从而提升去卵巢大鼠的骨密度, 最终对骨质疏松症起到了抑制作用。

参考文献

- [1] Cheung H Y, Zhang Q F. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1213(2): 231-238
- [2] 王川, 钟伟, 倪青. 夏枯草黄酮对猪油抗氧化作用的研究 [J]. 现代食品科技, 2010, 26(12): 1319-1321
WANG Chuan, ZHONG Wei, NI Qing. Antioxidation capability of flavones of spica prunellae on lard [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(12): 1319-1321
- [3] 何晓燕, 赵淑梅, 宫汝淳. 夏枯草对家兔降压作用机理的研究 [J]. 通化师范学院学报 (自然科学版), 2002, 23(5): 100-105
- [4] HE Xiao-yan, ZHAO Shu-mei, GONG Ru-chun. The mechanism study of lowering the blood pressure of rabbit with *Prunella asiatica* nakai [J]. Journal of Tonghua Teachers' College (Natural Science), 2002, 23(5): 100-105
- [5] Lee H, Lin JY. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine [J]. Mutation Research, 1988, 204(2): 229-234
- [6] 李东, 姜森. 中药白毛夏枯草水提液体外抗肿瘤研究 [J]. 吉林老中医, 2009, 29(5): 434-435
- [7] LI Dong, JIANG Sen. Research of water extraction liquids of traditional Chinese medicine Herba Ajugae on anti tumor in vitro [J]. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2009, 29(5): 434-435
- [8] Horikawa K, Mohri T, Tanaka Y. Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1, 6-dinitropyrene and 3, 9-dinitrofluoranthene by Chinese medicine [J]. Mutagenesis, 1994, 9(6): 523-526
- [9] 马丽萍, 赵培荣, 田爱琴, 等. 夏枯草对 ECa109 细胞的影响 [J]. 肿瘤基础与临床, 2006, 119(13): 199-200
- [10] MA Li-ping, ZHAO Pei-rong, TIAN Ai-qin, et al. The effect of *Prunella Vulgaris* L on Eca109 cells [J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2006, 119(13): 199-200
- [11] 张国文, 何力, 胡明明. 大孔吸附树脂分离纯化夏枯草黄酮 [J]. 南昌大学学报 (理科版), 2010, 34(5): 451-454
- [12] ZHANG Guo-wen, HE Li, HU Yue-ming. The separation and purification of total flavonoids from *Prunella vulgaris* L. by macroporous resin [J]. Journal of Nanchang University (Natural Science), 2010, 34(5): 451-454
- [13] 郑杰, 张柳, 韩大成. 辛伐他汀体内给药部分阻止大鼠去卵巢导的骨丢失 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 14(9): 654-658

- ZHENG Jie, ZHANG Liu, HAN Da-cheng. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2009, 14(9): 654-658
- [10] 张巧艳,秦路平,黄宝康,等.蛇床子总香豆素对去卵巢大鼠骨质疏松症的作用[J].药理,2003,38(2):101-103
- ZHANG Qiao-yan, QIN Lu-ping, HUANG Bao-kang, et al. Study on effects of total coumarines from the fruits of *Cnidium monnieri* on osteoporosis in ovariectomized rats [J]. Chinese pharmacology Journal, 2003, 38(2): 101-103
- [11] Gennari L, Merlotti D, Martini G, et al. Longitudinal association between sex hormone levels, bone loss, and bone turnover in elderly men [J]. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2003, 88(11): 5327-5333
- [12] Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2003, 89(1): 9-18
- [13] Bucay N, Sarosi I, Dunstan C R, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification [J]. Genes & Development, 1998, 12(9): 1260-1268
- [14] 卢天祥,杨华,吴银生,等.健骨颗粒对去卵巢骨质疏松模型鼠整合素信号转导通路的影响[J].福建中医学院学报, 2009,19(2):37-40
- LU Tian-xiang, YANG Hua, WU Yin-sheng, et al. Effect of Jiangu granule on integrin signal transduction pathway in ovariectomized osteoporosis model rats [J]. Journal of Fujian University of TCM, 2009, 19(2): 37-40
- [15] 林燕萍,马建华,冯尔宥,等.健骨颗粒对去卵巢大鼠骨质疏松症预防作用的研究[J].中国中西医结合杂志, 2002, 22(5):369-371
- LIN Yan-ping, MA Jian-hua, FENG Er-you, et al. Study on preventive effect of Jiangu granule on osteoporosis in ovariectomized rats [J]. Chinese Journal of integrated traditional Chinese and Western Medicine, 2002, 22(5): 369-371
- [16] 李朝阳,吴铁,黄连芳,等.黄芪水提液与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢的影响[J].中药学,1998,29(1):27-30
- LI Chao-yang, WU Tie, HUANG Lian-fang, et al. Effects of huangqi (*Astragalus membranaceus*) and DES on skeleton of ovariectomized rats [J]. Journal of Chinese Pharmacy, 1998, 29(1): 27-30
- [17] Tucker K L, Hannan M T, Chen H, et al. Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1999, 69(4): 727-736
- [18] 李凤林.红景天苷药理作用的研究现状[J].现代食品科技,2013,29(4):916-920
- LI Feng-lin. Research progress in pharmacological effects of salidroside from *rhodiola* [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(4): 916-920
- [19] Salaszyk R M, Williams W A, Boskey A, Batorsky A, Plopper G E. Adhesion to vitronectin and collagen i promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2004, 23(1): 24-34
- [20] Teitelbaum S L. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis [J]. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2000, 18(6): 344-349